

おらず、少なくとも今回得られた結果は、扁桃核以外の責任部位の相違に基づく可能性もあり、本件についてはさらなる検討が必要である。

一方、我々はこれまでに THC によるレバー押し行動の抑制作用は、アラキドン酸カスケードならびにプロスタグランジン EP3 受容体を介して発現する事を報告した⁴⁾。また、MAP 探索行動は COX 阻害薬により抑制される事も明らかにしている¹⁾。これらを背景に、MAP 探索行動の発現における EP 受容体の関与を調べた。その結果、MAP 探索行動の発現には、EP1 あるいは EP3 受容体が促進的に関わっている事が明らかとなった。EP 受容体は EP1~EP4 の4つのサブタイプが同定されており、特に EP3 受容体は青斑核などのノルアドレナリン神経核に発現していることが明らかにされている¹²⁾。また、EP1 受容体も近年、薬物探索行動の発現に関わるドーパミン神経系との関連性が指摘されている¹³⁾。EP1 あるいは EP3 受容体の活性化による MAP 探索行動発現の抑制作用は、EP 受容体の下流にて働くカテコラミン神経系の関与が考えられる。

認知機能の検討では、URB597 は新奇物体認識試験において認知機能障害を誘発し、この障害は CB₁ 受容体ならびに COX を介したアラキドン酸カスケードの活性化により発現する事が明らかとなった。また、MAP 反復投与後の退薬時においても同様に認知機能障害が認められ、この障害もまたアラキドン酸カスケードの活性化により発現する事が明らかとなった。これまでに乱用性薬物 MDMA³⁾ならびに MAP (unpublished data) 退薬時に認められる認知機能障害は CB₁ 受容体の活性化を介して発現する事を

報告している。これらの結果を考慮すると、MAP 退薬時に認められる認知機能障害は、CB₁ 受容体を介したアラキドン酸カスケードの活性化に基づき発現している可能性が示唆される。

3. MAP 退薬時に発現する薬物探索行動ならびに認知機能障害におけるエンドカンナビノイド 2-AG の関与

エンドカンナビノイドの1つである 2-AG に着目して、MAP 探索行動の発現機序ならびに 2-AG 分解酵素阻害薬 JZL184¹⁴⁾ の薬物依存症治療薬としての可能性を探索した。

2-AG は anandamide と同様の生理学的役割を演じている事が示唆されているが、両者の作用は必ずしも同一ではない。Busquets-Garcia らは、anandamide と 2-AG のそれぞれの分解酵素阻害薬である URB597 と JZL184 を用いて、抗不安作用と鎮痛作用は共通に発現するが、鎮痛作用に関しては JZL184 がより低用量にて発現することから、2-AG を介した疼痛制御機構が生理的であると示唆している¹⁵⁾。

2-AG 分解酵素阻害薬 JZL184 は、anandamide 分解酵素阻害薬 URB597 と同様に cue 呈示による MAP 探索行動に対し著明な抑制作用を示したが、MAP-priming 投与による MAP 探索行動には両薬物は抑制作用を示さなかった。しかしながら、footshock 負荷による MAP 探索行動に対して JZL184 は抑制作用を示したが、URB597 では作用が無かった。このようにストレス負荷による MAP 探索行動に対して、2-AG 及び anandamide 間に作用態度の相違が示唆された。これまで MAP 探索行動の発現は、誘発因子によって脳内発現機序が異なる事を、

リドカインを用いた我々の実験から明らかにしてきた¹¹⁾。その結果、cue 呈示による MAP 探索行動の発現に扁桃体が促進的に関わるが、MAP-priming 投与によるそれには関与しない事を明らかにしている¹¹⁾。さらに我々は、ストレス負荷による MAP 探索行動の発現には、扁桃体のコルチコトロピン遊離因子(CRF)の関与を指摘した¹⁶⁾。この扁桃体における anandamide や 2-AG の分布の相違は未だ報告されていないので明言できないが、少なくとも扁桃体以外に責任部位がある可能性が指摘される。

一方、新奇物体認識試験において、URB597 は認知機能障害を誘発したが、JZL184 は認知機能に影響を与えなかった。Busquets-Garcia とも anandamide および 2-AG は記憶の制御機構において全く異なった反応を示すことを指摘している¹⁵⁾。URB597 による anandamide の増加を介した記憶障害には、 Δ^9 -THC による CB₁ 受容体を活性化した場合と同様の神経伝達あるいは細胞内情報伝達を誘引すること^{17,18)}が報告されており、2-AG ではこれらの経路を介さないことが明らかにされている¹⁵⁾。したがって、JZL184 は、2-AG の増加を介した CB₁ 受容体の活性化に関連する薬理作用を期待した医薬品開発において、記憶障害などの有害作用のない有用な化合物候補となることが考えられた。

4. 生殖機能に及ぼす大麻活性成分 Δ^9 -THC の反復投与による作用

ヒトにおいて大麻喫煙は精子形成に異常を与え、精子の成熟と運動性にも重大な影響を与えることが報告されている¹⁹⁾。近年、CB₁ 受容体および CB₂ 受容体が同定され、

リガンドを用いた動物での研究が進められ、ラットやマウスを用いた動物実験で Δ^9 -THC の投与が精子形成、特に精子の核形成に異常を与えることが示唆されている^{20,21)}。本実験において、まずマウス精子に CB₁ および CB₂ 受容体が発現していることを明らかにし、 Δ^9 -THC を 30 日間反復投与後の雄マウスの精子形態の異常が多数観察された。このことから Δ^9 -THC は、直接的、間接的に精子形成に影響を与えることが明らかになり、退薬後の回復が期待できるのか否か、また産仔の行動障害等の発現の有無等の追究に興味を持たれる。また、雄の Δ^9 -THC 投与群の産仔に発生異常が見られたことから Δ^9 -THC によるエピゲノミックな異常や遺伝子変異の可能性についての追究も必須である。

E. 結論

以上のことから、①MAP 退薬時に認められるストレス誘発性 MAP 探索行動ならびに認知機能障害は、いずれも CB₁ 受容体の活性化により発現する事が明らかになった。また、footshock 誘発性の MAP 探索行動の発現にはコルチコステロンの関与は無い事が示唆された。②cue 呈示によって誘発される MAP 探索行動は、脳内 anandamide の増加によって抑制されることが明らかとなった。また、MAP 退薬時での認知機能障害は、CB₁ 受容体を介したアラキドン酸カスケードの活性化により発現している可能性が考えられる。③cue 呈示およびストレス負荷によって誘発されるは、脳内 2-AG の増加を伴うカンナビノイドシステムの活性化によって抑制されることが明らかとなった。④

Δ^9 -THC の反復投与により、胎仔の発育障害や催奇形性ならびに育仔異常を誘発する可能性が示唆された。

これらの知見を総括すると、渴望の誘発因子による相違が存在するが、MAP 探索行動の発現機序には CB_1 受容体を介した脳内カンナビノイドシステムの調節機構が関与し、2-AG 分解酵素の阻害作用を有する薬物は、渴望を抑制する覚せい剤依存症の最も有力な治療薬候補として期待することができると考えられた。

[謝 辞]

生殖機能（繁殖能および精子細胞機能）の技術指導においてご協力を頂きました田中宏光 博士（長崎国際大学薬学部分子生物学研究室・准教授）に感謝致します。

[参考文献]

- 1) Anggadiredja K, Nakamichi M, Hiranita T, Tanaka H, Shoyama Y, Watanabe S, Yamamoto T.: Endocannabinoid system modulates relapse to methamphetamine seeking: possible mediation by the arachidonic acid cascade. *Neuropsychopharmacology*, 29: 1470-1478, 2004.
- 2) Sofuoglu, M.: Cognitive enhancement as a pharmacotherapy target for stimulant addiction. *Addiction*, 105: 38-48, 2010.
- 3) Nawata, Y., Hiranita, T. Yamamoto, T.: A cannabinoid CB_1 receptor antagonist ameliorates impairment of recognition memory on withdrawal from MDMA (Ecstasy). *Neuropsychopharmacology*, 35: 515-520, 2010.
- 4) Yamaguchi, T., Kubota, T., Watanabe, S., Yamamoto, T.: Activation of brain prostanoid EP3 receptors via arachidonic acid cascade during behavioral suppression induced by Delta8-tetrahydro -cannabinol. *J Neurochem.*, 88: 148-54, 2004.
- 5) Akirav I, Kozenicky M, Tal D, Sandi C, Venero C, Richter-Levin G.: A facilitative role for corticosterone in the acquisition of a spatial task under moderate stress. *Learn. Mem.*, 11: 188-195, 2004.
- 6) Rougé-Pont F, Marinelli M, Le Moal M, Simon H, Piazza PV.: Stress-induced sensitization and glucocorticoids. II. Sensitization of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterone secretion. *J. Neurosci.*, 15: 7189-7195, 1995.
- 7) Hill MN, McLaughlin RJ, Bingham B, Shrestha L, Lee TT, Gray JM, Hillard CJ, Gorzalka BB, Vau V.: Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 9406-9411, 2010.
- 8) Shaham, Y. and Stewart, J.: Effects of opioid and dopamine receptor antagonists on relapse induced by stress and re-exposure to heroin in rats. *Psychopharmacology*, 125: 385-391, 1996.
- 9) Hiranita, T., Nawata, Y., Sakimura, K., Yamamoto, T.: Methamphetamine-seeking behavior is due to inhibition of nicotinic cholinergic transmission by activation of cannabinoid CB_1 receptors. *Neuropharmacology*, 55: 1300-1306, 2008.
- 10) Fegley, D., Gaetani, S., Duranti, A., Tontini,

- A., Mor, M., Tarzia, G., Piomelli, D.: Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl -3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. *J Pharmacol Exp Ther.*, 313: 352- 358, 2005.
- 11) Hiranita T., Sakimura K., Nawata Y., Anggadiredja K., Yamamoto T.: The possibility of nicotinic activators as craving killers in methamphetamine dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103: 8523-8527, 2006.
- 12) Sugimoto, Y., Narumiya, S.: Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem.*, 282: 11613-11617, 2007.
- 13) Kitaoka, S., Furuyashiki, T., Nishi, A., Shuto, T., Koyasu, S., Matsuoka, T., Miyasaka, M., Greengard, P., Narumiya, S.: Prostaglandin E2 acts on EP1 receptor and amplifies both dopamine D1 and D2 receptor signaling in the striatum. *J Neurosci.*, 27: 12900-12907, 2007.
- 14) Long JZ, Li W, Booker L, et al. (2009) Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol* 5:37-44.
- 15) Busquets-Garcia A, Puighermanal E, Pastor A, et al. (2011) Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biol Psychiatry* 70:479-86.
- 16) Nawata, Y, Hiranita T, Yamamoto T. (2010) A cannabinoid CB1 receptor antagonist ameliorates impairment of recognition memory on withdrawal from MDMA (Ecstasy). *Neuropsychopharmacology* 35:515-520.
- 17) Kim J, Alger BE. (2010) Reduction in endocannabinoid tone is a homeostatic mechanism for specific inhibitory synapses. *Nat Neurosci* 13:592-600.
- 18) Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, et al. (2009) Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci* 12:1152-1158.
- 19) Battista N, Rapino C, Di Tommaso M, et al. (2008) Regulation of male fertility by the endocannabinoid system. *Mol Cell Endocrinol* 286:S17-23.
- 20) Chioccarelli T, Cacciola G, Altucci L, et al. (2010) Cannabinoid Receptor 1 Influences Chromatin Remodeling in Mouse Spermatids by Affecting Content of Transition Protein 2 mRNA and Histone Displacement. *Endocrinology* 151:5017-5029.
- 21) Grimaldia P, Orlandob P, Siennaa DA, et al. (2009) The endocannabinoid system and pivotal role of the CB2 receptor in mouse spermatogenesis., *Proc Natl Acad Sci USA* 106:11131-11136.

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida, R., Ohkuri, T., Jyotaki, M., Yasuo, T., Horio, N., Yasumatsu, K., Sanematsu, K., Shigemura, N., Yamamoto, T., Margolskee, R.F. and Ninomiya, Y.: Endocannabinoids

- selectively enhance sweet taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 107: 935-939, 2010.
- 2) Hiranita, T., Yamamoto, T. and Nawata, Y.: A tryptamine-derived catecholaminergic enhancer, (-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylamino-pentane [(-)-BPAP], attenuates reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in rats. *Neuroscience*, 165: 300-312, 2010.
- 3) Nawata, Y., Hiranita, T. and Yamamoto, T.: A cannabinoid CB1 receptor antagonist ameliorates impairment of recognition memory on withdrawal from MDMA (Ecstasy). *Neuropsychopharmacology*, 35: 515-520, 2010.
- 4) Nawata, Y., Kitaichi, K., Yamamoto, T.: Increases of CRF in the amygdala are responsible for reinstatement of methamphetamine-seeking behavior induced by footshock. *Pharmacol Biochem Behav.*, 101: 297-302, 2012.
- 5) 山本経之 (共著): エンドカンナビノイドと依存. *脳科学エッセンシャル—精神疾患の生物学的理解のために*, p234-235, 東京, 中山書店, 2010.
- 6) 山本経之 (共著): 第I編, 1創薬に向けての動物モデルの役割と問題点. *実践行動薬理学*, p3-10, 京都, 2010.
- 7) 山本経之 (共著): 第II編, 第4章, 4脳内報酬系における内因性/外因性カンナビノイドの作用. *実践行動薬理学*, p282-290, 京都, 2010.
- 8) 縄田陽子, 恐怖記憶の消去を司るエンドカンナビノイド: PTSD治療への可能性. *ファルマシア*, 46: 895-896, 2010.
- 9) 山本経之, 縄田陽子.: 16. 依存, VI. 薬物依存の基礎と臨床, 4. 大麻依存, a. 大麻依存の基礎. *脳とこころのプライマリケア*第8巻, pp264-280, シナジー, 東京, 2011.
- 10) 縄田陽子, 北市清幸, 山本経之.: footshockにより誘発される覚せい剤メタンフェタミン探索行動における副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) の促進的関与. *日本神経精神薬理学雑誌* 31: 73-5, 2011
- 11) 縄田陽子, 山口拓, 山本経之.: 覚せい剤メタンフェタミン退薬時に認められる認知機能障害に対するカンナビノイドCB1受容体拮抗薬ならびにCOX阻害薬による改善. *日本神経精神薬理学雑誌*. 32: 93-94, 2012

2. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Nawata Y, Kitaichi K, Yamamoto T: The facilitating role of corticotropin-releasing factor (CRF) in reinstatement of methamphetamine-seeking behavior induced by footshock stress. *The International College of Neuropsychopharmacology (CINP) 52nd Annual Meeting (Hong Kong, China, June, 2010)*
- 2) Nawata, Y., Yamaguchi T., Yamamoto, T.: Improvement of cognitive impairments on withdrawal after repeated methamphetamine by administration of a cannabinoid CB1 receptor antagonist and a COX inhibitor. *2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (Seoul, September 24, 2011)*

3) Nawata, Y., Kitaichi, K., Yamamoto, T.: Activation of the corticotropin-releasing factor (CRF) system in the amygdala is responsible for the reinstatement of methamphetamine-seeking behavior induced by footshock stress. The College on Problems of Drug Dependence (CPDD) 73rd Annual Meeting (Hollywood, USA, June 23, 2011)

2. 国内学会

1) 北市清幸, 縄田陽子, 山本経之: Decreased expression of organic cation transporter3 with self-administration of methamphetamine in rats. 日本薬理学会西南部会 (鹿児島, 2010年11月)

2) 縄田陽子, 北市清幸, 山本経之: A cannabinoid CB1 receptor antagonist ameliorates cognitive impairment on withdrawal from abusive drugs. 日本薬理学会西南部会 (鹿児島, 2010年11月)

3) 縄田陽子, 北市清幸, 山本経之: ストレス誘発性メタンフェタミン探索行動の発現における扁桃体内副腎皮質刺激ホルモン放出因子の役割. アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 (北九州, 2010年10月)

4) 北市清幸, 縄田陽子, 山本経之: 覚醒剤依存症動物モデルにおける有機カチオントランスポーターOCT3 (SLC22A3) の発現変容. 第4会第4回トランスポーター研究会九州部会 (佐世保, 2010年9月)

5) 縄田陽子, 北市清幸, 山本経之: Activation of the corticotropin-releasing factor (CRF) system in the amygdala is responsible for the reinstatement of methamphetamine-seeking behavior induced by footshock stress. 平成23年度アルコール・薬物依存関連学会合同学

術総会 (名古屋, 2011年10月)

6) Nawata, Y. and Yamamoto, T.: The involvement of the cannabinoid CB₁ receptor in the reinstatement of MDMA-seeking behavior and cognitive impairment during withdrawal from MDMA (Ecstasy). 第32回内藤コンファレンス (北杜, 2011年10月)

7) 縄田陽子, 山口 拓, 山本経之: 合成麻薬 MDMA 退薬時における薬物探索行動の再燃と認知機能障害におけるカンナビノイドCB₁受容体の関与. 平成24年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 (名古屋, 2011年10月)

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 発明者 山本経之 (出願人 九州大学/藤本製薬) 出願 EP20050809728 ; 特許公報 EP1815853 (2009-4-22 ; ヨーロッパ15ヶ国) : 「薬物依存症治療剤」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

「乱用薬物による薬物依存の発症メカニズム・予防・診断
及び治療法についての研究」

平成 22 年度～平成 24 年度総合研究報告書

薬物依存形成における脳内エピジェネティクス制御機構の解析

研究分担者：鈴木 勉

研究協力者：森 友久、芝崎真裕

(星薬科大学薬品毒性学教室)

[研究要旨]

覚せい剤などの依存性薬物を摂取することにより、中脳辺縁ドパミン神経系の長期的な可塑的变化が誘導されることが知られている。現在までに、神経可塑的变化などの細胞の長期的な変化に、クロマチンの再構築を伴った遺伝子のエピジェネティックな修飾が重要な役割を担っていることが報告されている。そこでまず methamphetamine (METH) 誘発逆耐性獲得動物の側坐核よりサンプルを作製し、エピジェネティクス制御について網羅的解析を行った。その結果、METH 誘発逆耐性獲得動物の側坐核では Chemokine (C-C motif) receptor type 2 (CCR2) 遺伝子のプロモーター領域において、H3K4me3 の有意な増加が認められ、CCR2 が METH の依存症に関与することが明らかとなった。CCR2 は 7 回膜貫通三量体 G タンパク質共役型受容体であり、免疫応答に関与することが知られていることから、METH の依存症に免疫応答が関与する可能性が考えられる。そこで免疫系を活性化させる目的で、lipopolysaccharides (LPS) を用いて検討を行ったところ、LPS を処置することにより METH 誘発報酬効果および逆耐性の有意な抑制が観察された。そこで、LPS 処置時における各種インターロイキン類の変化について、RT-PCR 法を用いて検討したところ、末梢血を用いた検討では、LPS 処置 1 時間後において CCR2 のアゴニストである CCL2 mRNA 量の有意な増加が認められた。一方、側坐核領域では、対照群に対し LPS を処置したマウスにおいて IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA 量の著明な増加が観察された。そこで、脳における免疫系を担うミクログリアについて検討したところ、LPS 処置によりミクログリアの活性化が認められた。さらに免疫細胞の関与について検討する目的で、マウスより採取した脾臓細胞を培養し、LPS を 1 時間曝露した後、その培養上清を脳室内投与したところ、METH 誘発自発運動促進作用が有意に抑制されたのに対して、同上清の静脈内投与では METH 誘発自発運動促進作用に変化は認められなかった。したがって、LPS による作用は免疫反応を介し中枢神経に影響を及ぼしている可能性が示唆された。現在までに免疫細胞上に cannabinoid receptor 2 (CB2R) が存在することや、CB2R が cocaine の依存に関与することが報告されていることから、これらの変化に CB2R が関与する可能性が考えられる。そこで LPS による METH 誘発報酬効果抑制作用における CB2R の関与について検討したところ、LPS を前処置することにより抑制される METH 誘発報酬効果は、

CB2R 拮抗薬である AM630 を前処置することにより有意に消失したことから、LPS 処置により内因性カンナビノイドの関与が推定される。そこで CB2R を介する細胞内情報伝達系の変化について検討を行ったところ、LPS を処置した動物の脳内において内因性マトリックスメタロプロテアーゼ阻害因子である、tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1) mRNA の有意な増加が認められた。以上本研究の結果より、LPS による免疫系の活性化が CB2Rs-TIMP1 を介し、METH による依存形成の抑制に一部関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

Methamphetamine (METH) などの依存性薬物による精神依存の形成ならびに発現機序を明らかにすることは、社会医学的にも重要な問題と考えられ、従来から神経行動薬理学的および臨床医学的側面からの確かな診断法・治療法の開発に向けて精力的な検討が行われている。しかしながら、未だ依存形成機序を解明するには至っていないのが現状である。

覚せい剤などの依存性薬物を摂取することにより、中脳辺縁ドパミン神経系の長期的な可塑的变化が誘導されることが知られている^{1,2)}。現在までに、神経可塑的变化などの細胞の長期的な変化に、クロマチンの再構築を伴った遺伝子のエピジェネティックな修飾が重要な役割を担っていることが知られている。一方、薬物依存症患者における細菌感染抵抗性の低下が報告されている³⁾。近年、HIV タンパク (Tat) により cocaine によるドパミン関連行動が増強されることも報告されている。すなわち、免疫応答が中枢における神経の可塑的变化に関与する可能性が示唆される。事実、当教室の結果において lipopolysaccharide (LPS) が cocaine 誘発報酬効果を抑制することを報告しており、薬物依存症に中枢神経系における免疫系が深く関与している可能性が考えられる。このように、薬物依存症に中

枢神経系における免疫系が深く関与している可能性が考えられるが、その詳細な検討はほとんどなされていないのが現状である⁴⁾。一般に、免疫を司る B 細胞、NK 細胞、単核球、ミクログリア細胞、好中球、T 細胞、樹状細胞及び肥満細胞には様々な受容体が存在し、生体の状況に応じこれらの受容体を介した反応が引き起こされる。また近年、cocaine の報酬効果に CB2R が関与することが報告された⁹⁾。CB2 受容体は免疫細胞上に多く存在することが知られていることから、このことは幅広い免疫機能が CB2R モデュレーターにより調節される可能性が示唆される。しかしながら、薬物依存における免疫応答の関与については殆ど明らかになっていない。

一方、CB2R を介し tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) が matrix metalloproteinases (MMPs) を阻害することが報告されている⁵⁾。MMP は神経細胞間などの間隙を埋める足場蛋白である細胞外マトリックスを調節することが知られており、METH 誘発逆耐性および報酬効果に MMP2 が関与することが報告されている⁶⁾。したがって、METH による精神依存時の神経の可塑的变化に対し、神経免疫系を介した CB2R-TIMP1 経路が関与する可能性が考えられる。

そこで本研究では、METH による精神依

存形成を制御するエピジェネティック修飾を伴った遺伝子発現変化の包括的理解を目的として、多角的な分子生物学的検討を行った。さらにこれらの反応における神経免疫の関与について検討する目的で、免疫系を活性化する lipopolysaccharides (LPS) を用いて、細胞間および細胞内情報伝達系の変化、特に、CB2R-TIMP1 系を中心に検討した。

B. 研究方法

本研究を遂行するにあたり、星薬科大学動物実験指針に従い、本学の動物実験委員会で承認を得た上で、動物に対する倫理面を十分に考慮して全ての実験を行った。

1. 使用動物

実験には 6 週齢の ICR 系雄性マウスを使用した。マウスは恒温室 ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) において飼育し、明暗条件は 8:00 点燈、20:00 消燈の 12 時間サイクルとした。摂餌 (固形試料 MF; オリエンタル酵母工業) および飲水 (水道水) はともに自由摂取とした。

2. 精神依存の評価

METH による精神依存は conditioned place preference (CPP) 法を用いた報酬効果により評価した。実験装置は白および黒からなる compartment box を使用した。条件づけの前日あるいは翌日に、白および黒の区画を自由に往来させ、それぞれの区画における滞在時間を測定し、これをそれぞれ pre-test 値および post-test 値とした。条件づけは 1 日 1 回行い、1 日目には pre-test 値の低い方の区画に METH (1 mg/kg, s.c.) を投与したマウスを 60 分間放置し、2 日目には saline を投与し、もう一方の区画に 60 分間放置する操作を

行い、この一連の操作を 1 session として、合計 3 session 行った。Saline のみで条件づけを行った群を溶媒対照群とした。Post-test 値と pre-test 値の差をスコア (sec) として算出した。また、LPS の影響については、LPS (1 mg/kg, i.p) を METH 処置の 30 分前に前処置した。

3. 自発運動量の測定

自発運動量の測定は、自発運動測定装置を使用し、tilting cage 法に従って行った。この方法はマウスをバケツ型ケージに 1 匹ずつ入れ、マウスの動きに伴うケージの傾きをマイクロスイッチを介してカウントし、これを自発運動量として測定する方法である。この装置にパーソナルコンピューターを接続し、測定値を連続的に入力させた。測定開始後の 30 分間はマウスを新しい環境に適応させるための時間とし、その後 METH (2 mg/kg, s.c.) を投与して自発運動量を 10 分間隔で計 180 分間にわたり連続的に測定した。また、LPS の影響については、LPS (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p) を METH 処置の 30 分前に前処置した。

4. 逆耐性形成モデルの作成

LPS の METH 誘発自発運動促進作用に対する逆耐性形成への影響について検討する目的で、マウスに 96 時間毎に上述の自発運動量の測定の操作を計 5 回行い評価した。

5. マウス新生仔脳由来初代培養アストロサイトの調整

生後 1 日齢の ICR 系マウスより採取した脳をメスにて細断したものに、PBS で 0.025 % に調整した trypsin 溶液を処理した。血清処理にて酵素反応を停止させ、遠心分離機にて 1,000 x g (2,400 rpm)、20 分

間で遠心分離して得られた沈渣を培養液中に分散させてフラスコ (75 cm² flask) に播種し、7 日間培養した。得られた細胞を 5×10^5 cells/mL の濃度に調整した後、8 well チャンバーに付着させて poly-D-lysine をコーティングしたカバーガラス上に播種したものを脳由来初代培養アストロサイトとした。初代培養アストロサイトは培養後 4 日目より実験に使用した。細胞は Dullbecco's modified Eagle's medium に 10 % ウマ血清および 0.1 % penicillin-streptomycin を添加した培地にて 37 °C、5 % CO₂ に維持されたインキュベーター内で培養した。

6. 脾臓細胞の培養

マウスより脾臓を摘出し、破碎後 3cm dish に播種し、DMEM にて培養した。培養 1 時間後、LPS (1 µg/dish) を 1 時間曝露し、その後 DMEM に培地交換し、さらに 1 時間後に spleen cells-conditioned medium として、培養上清を回収し実験に使用した。

7. 免疫組織学的染色法

METH 誘発報酬効果獲得動物および対照群のマウスを用いて、sodium pentobarbital (70 mg/kg, i.p.) 麻酔下、4% paraformaldehyde (pH 7.4) で灌流固定した。灌流後、脳を摘出し帯状回、側坐核を含む脳切片を 4% paraformaldehyde で 2 時間固定し、次いで sucrose にて置換した。この脳切片を液体窒素にて凍結後、クライオスタットにより 8 µm に薄切し、poly-L-lysine コート化スライドガラスに貼付した。切片は 10 % 正常ロバ血清に室温で 1 時間浸した。一次抗体として、Iba1 あるいは GFAP を 0.01M PBS で 100 倍希釈し、4 °C で 1 晩反応させた。0.01M PBS で洗浄し、切片に 0.01M PBS で

500 倍希釈した二次抗体 Alexa 546-cojugated donkey anti IgG を切片上に数滴加え、2 時間遮光して室温で反応させた。その後、切片にカバーガラスをのせ、これらの画像は蛍光顕微鏡で観察・撮影した。

8. Western blot 法

METH 誘発報酬効果獲得マウスあるいは対照群のマウスより全脳を摘出し、脳アトラスに従い側坐核を含む領域を分画した。組織を lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5mM EDTA, 10 mM NaF, 0.5 % Triton X-100 with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA)) と共に、テフロン-ガラスホモジナイザーにてホモジナイズした。サンプルに electro-phoresis sample buffer (2 % sodium dodecyl sulfate (SDS) and 10 % glycerol with 0.2 M dithiothreitol) を加え、SDS-PAGE 法により、7.5%のポリアクリルアミドゲル中の各レーンに標品 20 µg の蛋白量を注入し分離した。分離後、ニトロセルロースメンブランに転写させた。メンブランを 5 % nonfat dried milk を含む phosphate-buffered saline (PBS) 中でブロッキングし、一次抗体 (anti-phospho-ERK1/2 あるいは anti-phospho-p38) と 1 時間室温で反応させた後、二次抗体を加え室温にて更に 1 時間反応させた。反応後、蛍光法に従い、蛍光発色性の基質を用いて目的とするタンパク質を発色させた。

9. RT-PCR 法

薬物を処置したマウスの側坐核により、SV Total RNA Isolation を用いて total RNA を抽出した。First standard cDNA 作成のために、抽出した total RNA を oligo (dt)12-18 および diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水

と共に 70 °C で 10 分間インキュベーションした。その後、氷上で 2 分間急冷し、このサンプルに RT buffer 10 mL、0.1 M DTT 10 mL、25 mM MgCl₂ 10 mL、10 mM dNTP mix 1 mL を加え、70 °C で 5 分間のインキュベーションを行った。インキュベーション後、逆転写酵素である reverse transcriptase II 1mL を加え、42 °C で 45 分間および 70 °C で 5 分間のインキュベーションをそれぞれ行った。PCR は TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 および陽性対照として GAPDH の DNA 配列に基づいた primer を用いて増幅した。生成した PCR 産物の分析には、アガロースゲル電気泳動法を用いた。泳動終了後、ゲルを ethidium bromide 溶液にて反応させ、Fluor Chem 3 system で読み取り、GAPDH を陽性対照として、それぞれのバンドを補正した後に解析を行った。

10. 統計解析

すべてのデータは平均値 ± 標準誤差 (mean ± S.E.M.) で示した。有意性の評価には一元配置分散分析を用い、各値は Bonferroni/Dunnett's test を用いて評価した。

C. 研究結果

1. METH 誘発逆耐性獲得動物におけるヒストン修飾の解析

METH 誘発自発運動促進作用に対する逆耐性獲得動物における エピジェネティクス制御について解析する目的でヒストン修飾について検討した。その結果、Chemokine (C-C motif) receptor type 2 (CCR2) 遺伝子のプロモーター領域において、H3K4me3 の有意な増加が認められ、

METH 誘発逆耐性に CCR2 が関与することが明らかとなった (Fig. 1)。そこで、CCR2 欠損マウスを用いて、METH 誘発逆耐性に対する CCR2 の関与について検討したところ、CCR2 欠損マウスでは野生型マウス同様、METH 誘発逆耐性の形成が確認された。そこで、7 週間休薬後における METH 誘発逆耐性の維持について検討したところ、野生型では METH 誘発逆耐性の維持が認められたが、CCR2 欠損マウスでは METH 誘発逆耐性の消失が確認された (Fig. 2)。

2. METH 誘発報酬効果に対する LPS の影響

CCR2 は 7 回膜貫通三量体 G タンパク質共役型受容体であり、免疫応答に関与することが知られていることから、METH の依存症に免疫応答が関与する可能性が考えられる。そこで次に、免疫系を活性化させるために lipopolysaccharides (LPS) を用いて検討した。LPS (1 mg/kg, i.p.) を前処置し METH (1 mg/kg, s.c.) 誘発報酬効果に対する影響について条件づけ場所嗜好性試験法に従い検討した。その結果、METH による報酬効果の形成は LPS を前処置することにより有意に抑制された (Fig. 3)。

3. METH 誘発逆耐性形成に対する LPS の効果

METH 誘発自発運動促進作用および逆耐性形成に対する LPS の効果について検討した。LPS を前処置することにより METH 誘発自発運動促進作用は用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 4A, *p<0.05, ***p<0.001 vs. vehicle-treated mice., The data represent the mean ± S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, n=7-8)。そこで METH 誘発逆耐性について検討したとこ

ろ、対照群では METH の投与回数に比例した自発運動量の増加が認められたのに対し、LPS を前処置することにより、この増加は有意に抑制された (Fig. 4B, ** $p < 0.01$ vs. the first administration. ## $p < 0.01$ vs. vehicle-treated mice., The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=7-8$).

4. LPS による末梢血液および側坐核領域におけるサイトカイン/ケモカイン mRNA 発現量の変化

LPS 処置による影響について検討する目的で、LPS 処置 1 時間後の末梢血液における cytokine および chemokine mRNA の変化について検討した。その結果、CCR2 のリガンドである CCL2 および Interferon- γ (IFN- γ) の増加が認められた (Fig. 5)。また、同様の条件下、側坐核領域についても検討を行ったところ、IL-1 β , TNF- α , IL-6 および IFN- γ mRNA の増加が認められ、脳内においても免疫応答の亢進が確認された (Fig. 6)。

5. METH 誘発自発運動促進作用に対する LPS を曝露した培養脾臓細胞培養上清の効果

そこで次に、培養脾臓細胞を用いて METH 誘発自発運動促進作用に対する免疫細胞の影響について検討した。LPS あるいは溶媒を曝露した培養脾臓細胞の培養上清を静脈内投与したところ METH 誘発自発運動促進作用に影響は認められなかったが、脳室内投与した動物では METH 誘発自発運動促進作用は有意に抑制された (Fig. 7A and B, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. saline administration. # $p < 0.05$ vs. vehicle-treated mice., The data represent the mean \pm S.E.M.,

Bonferroni/Dunnett's test, $n=7-8$)。したがって、LPS により活性化された末梢の免疫細胞が中枢に移行し作用を誘導している可能性が示唆された。

6. METH 誘発報酬効果獲得動物の側坐核でのミクログリアの変化および LPS の影響

Fig. 6 においてグリア細胞の関与が示唆されたため、ミクログリアの変化について免疫組織染色法を用いて検討を行った。その結果、LPS の処置によりミクログリアの細胞数の増加ならびに活性化が認められた (Fig. 8)。

7. LPS による METH 誘発報酬効果の抑制作用に対する AM251 および AM630 の影響

そこで、LPS による METH 誘発報酬効果への抑制作用に対する CB1R および CB2R の関与について検討するために、CB1R の拮抗薬である AM251 および CB2R の拮抗薬である AM630 を LPS 処置 10 分前に前処置し、その影響について検討した。その結果、LPS による METH 誘発報酬効果の抑制は、AM251 および AM630 を前処置することによりいずれにおいても完全に消失した (Fig. 9, * $p < 0.05$ vs. each, The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=7-8$)。

8. LPS および 2-arachidonoylglycerol (2-AG) による側坐核領域における matrix metalloproteinase 2 (MMP2)、the tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) mRNA 発現量の変化

マウスに 2-AG (30 nmol/mouse, i.c.v.) を処置したときの MMP2, TIMP1 および TIMP2 の変化について検討した。その結果、

MMP2 および TIMP2 に変化は全く認められなかったが、TIMP1 においては 2-AG 処置 24 時間後に有意な増加が認められた (Fig. 10, *** $p < 0.001$ vs. vehicle-treated mice., The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=3$)。そこで LPS あるいは溶媒を処置した METH 誘発報酬効果獲得動物の側坐核領域における TIMP1 mRNA の発現変化について検討した。その結果、対照群および METH のみを処置した動物では TIMP1 mRNA に変化は認められないが、LPS を処置した動物において TIMP1 mRNA の有意な増加が認められた (Fig. 11, * $p < 0.05$ vs. saline administration, The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=3$)。

9. LPS による側坐核領域におけるリン酸化 ERK1/2 および p38 蛋白発現量の変化

そこで次に TIMP1 の発現を調節するリン酸化 ERK1/2 および p38 の変化について検討したところ、LPS および METH の処置により ERK1/2 のリン酸化の有意な増加が認められた (Fig. 12, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle-treated mice., The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=3$)。一方、p38 については LPS の処置によってのみ有意なリン酸化の増加が認められた (Fig. 13, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle-treated mice., The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=3$)。

10. METH および 2-arachidonoylglycerol (2-AG) 連続曝露による初代培養アストロサイトにおける MMP2, TIMP1 ならびに TIMP2 の変化

現在までに、METH 誘発報酬効果におい

てアストロサイトが関与することを報告している。そこで、初代培養アストロサイトを用いて、METH および内因性カンナビノイドである 2-AG の連続曝露による MMP2, TIMP1 および TIMP2 の変化について検討した。その結果、METH ならびに 2-AG の連続曝露において、TIMP1 および TIMP2 に有意な変化は認められなかったが、MMP2 は METH の連続曝露において有意な増加が認められた (Fig. 14, *** $p < 0.001$ vs. vehicle-treated mice., The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=3$)。

11. METH 誘発報酬効果獲得動物の側坐核でのアストロサイトの変化および LPS の影響

METH 誘発報酬効果を獲得した動物の側坐核において認められるアストロサイトの星状化は、LPS を共処置した動物では明らかな抑制が認められた (Fig. 15)。

12. METH 誘発報酬効果獲得動物の側坐核領域における GDNF mRNA 発現量の変化および LPS の影響

METH 誘発報酬効果による側坐核領域における glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) の発現変化に対する LPS の影響について検討を行った。その結果、METH により認められる GDNF mRNA の増加は LPS の処置により減少が認められた (Fig. 16)。

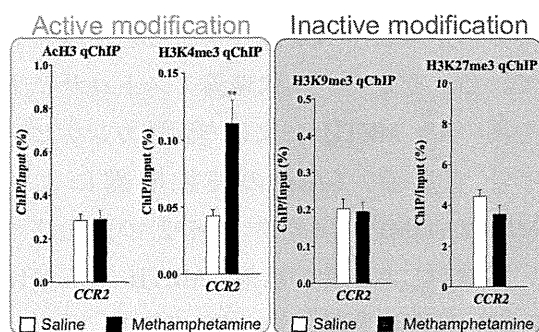


Fig. 1 qChIP analysis of acetylated histone H3 (AcH3), histone H3 trimethylated at lysine 4 (H3K4me3), lysine 9 (H3K9me3), and lysine 27 (H3K27me3) at CCR2 loci in the limbic forebrain of mice that had been intermittently treated with methamphetamine. Each column represents the mean \pm SEM ($n = 4$ animals per group; three independent experiments). $**P < 0.01$ vs. saline-treated mice.

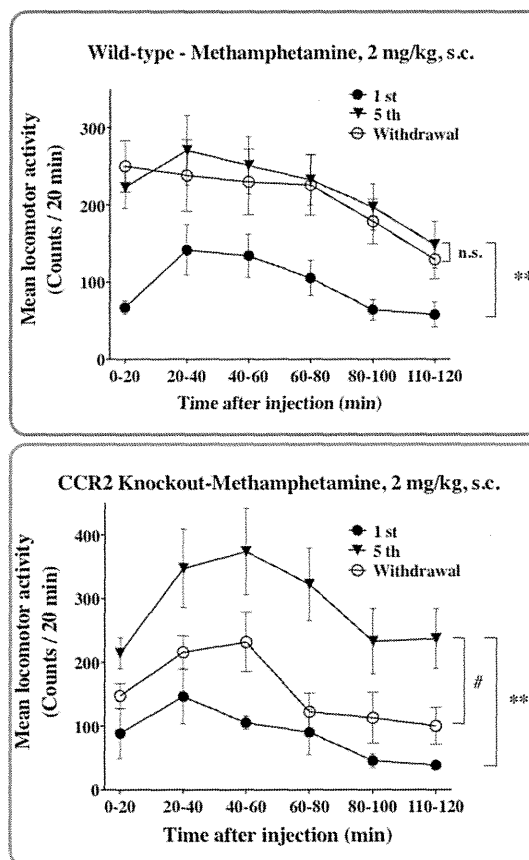


Fig. 2 Change in locomotor activity (per 20 minutes time intervals) following intermittent administration of methamphetamine (2 mg/kg, s.c.) in wild-type mice or CCR2 knockout mice. Mice were treated intermittently with methamphetamine every 96 hours for five sessions. '1st' represents the 1st injection group, whereas 5th shows the 5th injection group. Mice described as 'withdrawal' were again administered methamphetamine after seven weeks of withdrawal. $**P < 0.01$, 1st vs. 5th, $\#P < 0.05$, 5th versus withdrawal (two-way ANOVA). n.s., not significant. Each point represents the mean \pm SEM ($n = 4-17$ mice)

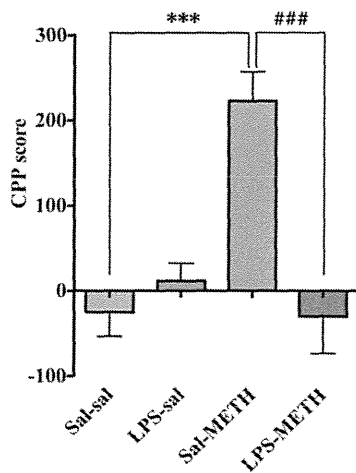


Fig. 3 Effect of LPS (1 mg/kg, i.p.) on the METH (1 mg/kg, s.c.)-induced rewarding effects in mice. The data represents the mean \pm SEM of eight mice. *** p < 0.001 vs. saline conditioned group, ### p < 0.001 vs. saline pre-treated group.

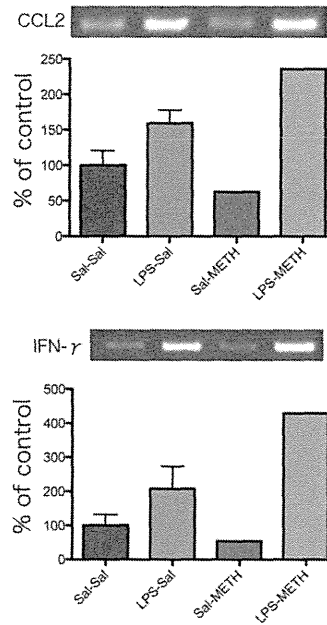


Fig. 5 Changes in mRNA levels of CCL2 and IFN- γ in the peripheral blood of mice after treatment with LPS (1 mg/kg, i.p.) and/or METH (1 mg/kg, s.c.).

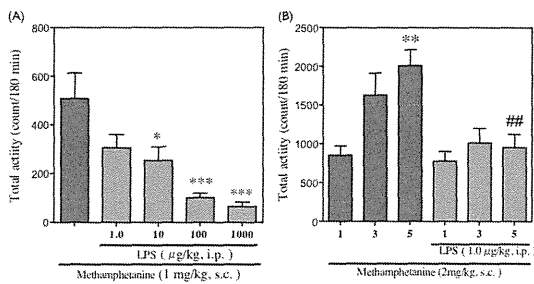


Fig. 4 Effect of LPS (1 μ g/kg, i.p.) on the hyperlocomotion (A) and development of sensitization (B) by METH (1-2 mg/kg, s.c.) in mice.

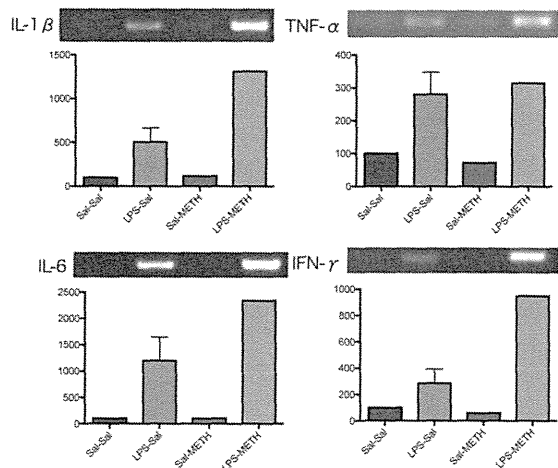


Fig. 6 Changes in mRNA levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IFN- γ in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1 mg/kg, i.p.) and/or METH (1 mg/kg, s.c.).

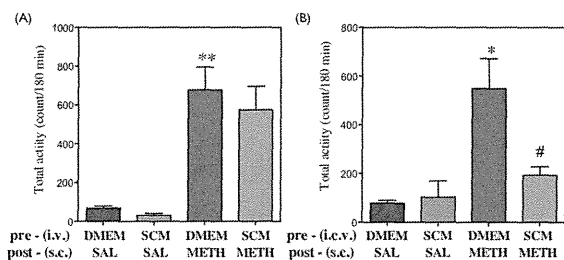


Fig. 7 Effects of spleen cells-conditioned medium (SCM, i.v. (A) or i.c.v. (B)) stimulated by LPS on the METH (2 mg/kg, s.c.)-induced hyperlocomotion.

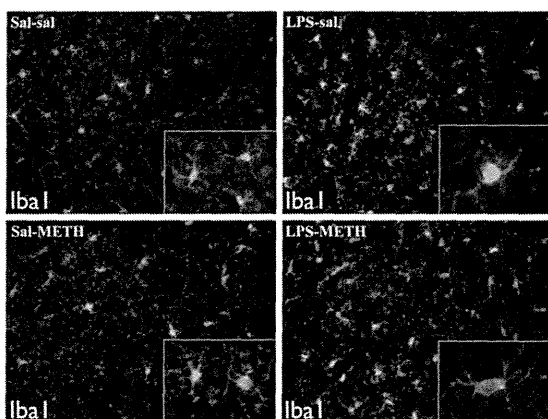


Fig. 8 Iba1-like immunoreactivity (IR) in the nucleus accumbens of mice after METH-induced place preference with or without cotreatment of LPS. The density of Iba1-IR was increased in the nucleus accumbens of mice treated with LPS.

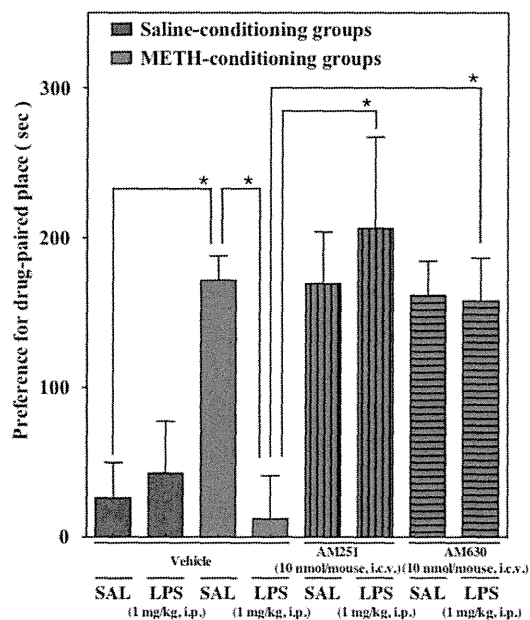


Fig. 9 Effect of LPS (1 mg/kg, i.p.) on the METH (1 mg/kg, s.c.)-induced rewarding effects with or without AM251 (10 nmol/mouse, i.c.v.) and AM630 (10 nmol/mouse, i.c.v.) in mice.

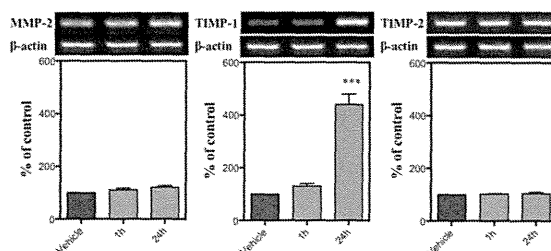


Fig. 10 Changes in mRNA levels of the matrix metalloproteinases 2 (MMP2), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) and TIMP2 in the limbic forebrain of mice after treatment with 2-AG (30 nmol/mouse, i.c.v.).

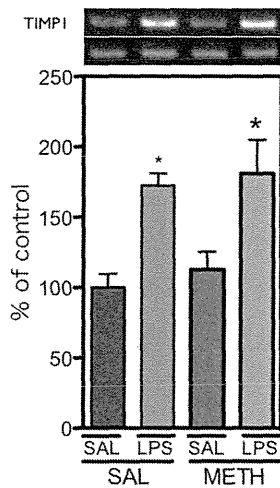


Fig. 11 Changes in mRNA levels of the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1 mg/kg, i.p.) and/or METH (1mg/kg, s.c.).

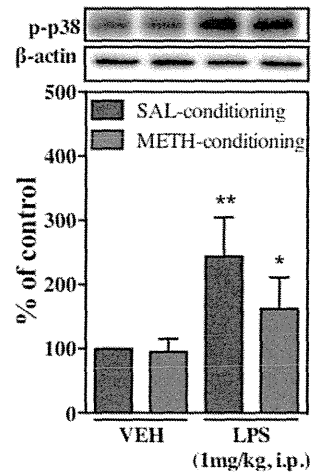


Fig. 13 Changes in protein levels of phospho-p38 in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1 mg/kg, i.p.) and/or METH (1 mg/kg, s.c.).

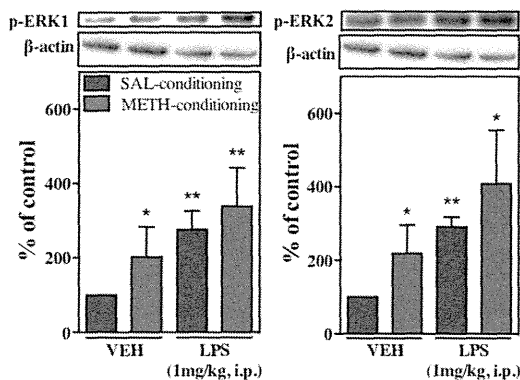


Fig. 12 Changes in protein levels of phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1 mg/kg, i.p.) and/or METH (1 mg/kg, s.c.).

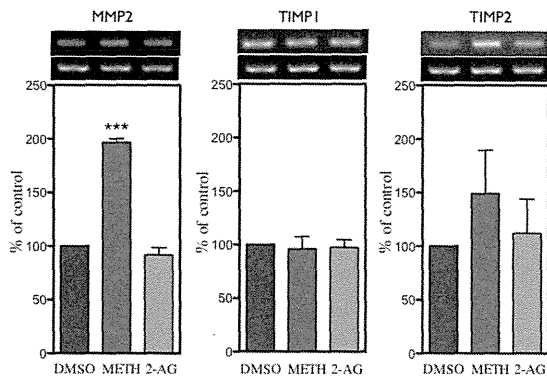


Fig. 14 Changes in mRNA levels of the matrix metalloproteinases 2 (MMP2), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) and TIMP2 in purified cortical astrocytes after treatment with METH (1 μM for 24 hr) or 2-AG (0.1 μM for 24 hr).

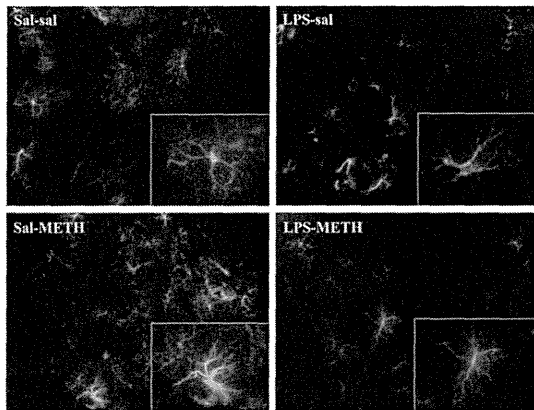


Fig. 15 GFAP-like immunoreactivity (IR) in the nucleus accumbens of mice on METH-*in*duce place preference with or without cotreatment of LPS. The density of GFAP-IR was increased in the nucleus accumbens of mice during the development of rewarding effect of METH. There were no changes in the density of GFAP-IR in the nucleus accumbens of mice treated with METH in combination with LPS as compared to saline treatment.

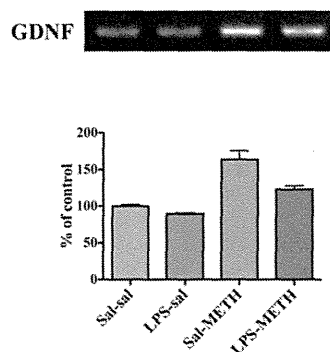


Fig. 16 Changes in mRNA levels of GDNF in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1 mg/kg, *i.p.*) and/or METH (1 mg/kg, *s.c.*).

D. 考察

本研究結果より、METH 誘発逆耐性に CCR2 の関与が示唆された。CCR2 は 7 回膜貫通型受容体であり、単球、T 細胞、好塩基球に存在し、免疫応答に関与することから、薬物依存に免疫系の影響が示唆される。現在までに、薬物依存症患者における細菌感染抵抗性の低下が報告されている³⁾。また、HIV タンパク (Tat) により cocaine によるドパミン関連行動が増強されることも報告されている。さらに、当教室の結果において LPS が cocaine 誘発報酬効果を抑制することを報告しており、これらの結果から、薬物依存症と免疫応答の低下に密接な関係があると想定される。そこで免疫応答を活性化させるために LPS を用いて検討を行ったところ、LPS 処置により METH 誘発報酬効果の抑制が認められた。また、LPS を処置することにより、末梢血液において CCL2 および IFN- γ mRNA の発現増加が認められたことから、これらの変化が中枢神経系に影響を及ぼすと推察される。また、CCR2 欠損動物では METH による逆耐性が維持されないことから、過剰な CCL2 の刺激により CCR2 の down-regulation が誘導され、これらの応答の破綻が METH による精神依存を抑制した可能性が示唆されるが、詳細については今後の検討課題である。

側坐核領域において METH により誘導されるアストロサイトの星状化および GDNF mRNA の増加は LPS により抑制された。また、LPS による METH 誘発報酬効果の抑制が CB1R 拮抗薬 AM251 および CB2R 拮抗薬 AM630 により消失したことから、これらの反応に内因性カンナビ

ノイドが関与するものと推察される。一般に、CB2R は特に免疫細胞に多く存在することが報告されており⁵⁾、LPS によりミクログリアの増加および活性化が認められることから、内因性カンナビノイドを介した反応が関与する可能性が示唆される。事実、CB2R 欠損動物では cocaine の精神依存が増強されることが報告されている⁹⁾。一方、2-AG の合成酵素である DAGL α はアストロサイトには殆ど存在せず、ミクログリアに存在することを見いだしている（データ未発表）。したがって、LPS により活性化されたミクログリアから、2-AG の遊離が引き起こされ、これが METH 誘発報酬効果の抑制を引き起こした可能性が考えられる。

現在までに、METH 誘発逆耐性および報酬効果に MMP2 が関与することが報告されている⁶⁾。一方、CB2R を介し tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) が matrix metalloproteinases (MMPs) を阻害することが報告されている⁷⁾。MMP は神経細胞間などの間隙を埋める足場蛋白である細胞外マトリックスを調節することが知られており、初代培養アストロサイトを用いた検討より、METH を連続曝露することにより MMP2 mRNA の有意な増加が認められた。また当教室の結果より、METH 誘発報酬効果の形成にアストロサイトが関与することを報告している⁸⁾。したがって、METH によるアストロサイトの活性化に伴った MMP2 の増加が METH 誘発報酬効果形成に重要な役割を果たすと考えられる。一方、LPS 処置により TIMP1 mRNA の増加が認められたことから、LPS による METH 誘発報酬効果抑制作用は TIMP1 が関与していると考えられる。また内因性カンナビノ

イドである 2-AG を処置することにより TIMP1 mRNA の著明な増加が認められることから、LPS による METH 誘発報酬効果抑制作用に CB2R-TIMP1 経路が関与する可能性が考えられる。これにより、METH による細胞外マトリックスに与える影響が、LPS により抑制されたと考えられ、さらに細胞間相互作用に影響を与えたと推察される。

そこで細胞間相互作用への影響について検討する目的で、アストロサイトに着目し検討を行ったところ、METH 誘発報酬効果獲得動物で認められる、アストロサイトの星状化は LPS 処置により抑制され、さらに METH による GDNF mRNA も LPS 処置により抑制された。当教室の研究結果より、アストロサイトが METH の依存に深く関与することを報告している⁶⁾。したがって、前述の CB2R-TIMP1 を介した足場蛋白である細胞外マトリックスがアストロサイトの星状化に影響を与えていると考えられるが、詳細については今後の検討課題である。

E. 結論

以上本研究結果より、METH による精神依存に免疫応答が深く関与することが明らかとなった。また、METH による依存形成に対し、LPS による免疫系の活性化が CB2R-TIMP1 を介し、抑制性に調整する可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) Robinson, T.E. and Berridge, K.C.: The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 18, 247-291 (1993).

- 2) Vanderschuren, L.J. and Kalivas, P.W.: Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)*. 151, 99-120 (2000).
- 3) Purohit, V., Rapaka, R., and Shurtleff, D.: Drugs of abuse, dopamine, and HIV-associated neurocognitive disorders/HIV-associated dementia. *Mol. Neurobiol.*, 44, 102-110 (2011).
- 4) Okutomi, T., Suzuki, T.: Immunomodulator as medicine for morphine and cocaine dependence. Especially effect of LPS. *Yakugaku Zasshi.*, 115, 42-51 (1995).
- 5) Fernández-Ruiz, J., Romero, J., Velasco, G., Tolón, R.M., Ramos, J.A., Guzmán, M.: Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol. Sci.*, 28, 39-45 (2007).
- 6) Narita, M., Miyatake, M., Narita, M., Shibasaki, M., Shindo, K., Nakamura, A., Kuzumaki, N., Nagumo, Y., Suzuki, T.: Direct evidence of astrocytic modulation in the development of rewarding effects induced by drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology*, 31, 2476-2488 (2006).
- 7) Xi, Z.X., Peng, X.Q., Li, X., Song, R., Zhang, H.Y., Liu, Q.R., Yang, H.J., Bi, G.H., Li, J., Gardner, E.L.: Brain cannabinoid CB₂ receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat. Neurosci.*, 14, 1160-1166 (2011).
- 8) Fujita, Y., Kunitachi, S., Iyo, M., Hashimoto, K.: The antibiotic minocycline prevents methamphetamine-induced rewarding effects in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 101, 303-306 (2012).
- 5) Ramer, R., Merkord, J., Rohde, H., Hinz, B.: Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *Biochem. Pharmacol.*, 79, 955-966 (2010)
- 6) Mizoguchi, H., Yamada, K., Niwa, M., Mouri, A., Mizuno, T., Noda, Y., Nitta, A., Itohara, S., Banno, Y., Nabeshima, T.: Reduction of methamphetamine-induced sensitization and reward in matrix metalloproteinase-2 and -9-deficient mice. *J. Neurochem.*, 100, 1579-1588 (2007)
- 7) Xi, Z.X., Peng, X.Q., Li, X., Song, R., Zhang, H.Y., Liu, Q.R., Yang, H.J., Bi, G.H., Li, J., Gardner, E.L.: Brain cannabinoid CB₂ receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat. Neurosci.*, 14, 1160-1166 (2011).
- 8) Narita M, Miyatake M, Narita M, Shibasaki M, Shindo K, Nakamura A, Kuzumaki N, Nagumo Y, Suzuki T.: Direct evidence of astrocytic modulation in the development of rewarding effects induced by drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology*. 31, 2476-2488 (2006)
- 9) Xi ZX, Peng XQ, Li X, Song R, Zhang HY, Liu QR, Yang HJ, Bi GH, Li J, Gardner EL. Brain cannabinoid CB₂ receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat Neurosci*. 14, 1160-1166 (2011)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Niikura, K., Narita, M., Butelman ER, Kreek MJ and Suzuki, T: Neuropathic and chronic pain stimuli downregulate central μ -opioid and dopaminergic transmission. *Trends Pharmacol Sci* 31, 299-305, 2010.
2. Ikegami, D., Narita, M., Imai, S., Miyashita, K., Tamura, R., Narita, M., Takagi, S., Yokomizo, A., Takeshima, H., Ando, T., Igarashi, K., Kanno, J., Kuzumaki, N., Ushijima, T. and Suzuki, T.: Epigenetic modulation at the CCR2 gene correlates with the maintenance of behavioral sensitization to methamphetamine. *Addict Biol* 15, 358-361, 2010.
3. Narita, M., Matsushima, Y., Niikura, K., Narita, M., Takagi, S., Nakahara, K., Kurahashi,